

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICH NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation 5 : C12Q 1/68, C07K 15/28, 13/00 G01N 33/569</p>		A1	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 90/08197</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. Juli 1990 (26.07.90)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP90/00087</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 17. Januar 1990 (17.01.90)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 39 01 397.9 19. Januar 1989 (19.01.89) DE P 39 06 832.3 3. März 1989 (03.03.89) DE</p> <p>(71) Anmelder (<i>für alle Bestimmungsstaaten ausser US</i>): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (<i>nur für US</i>): CHAKRABORTY, Trinad [SG/DE]; Friedrichstr. 12, D-8700 Würzburg (DE). GOEBEL, Werner [DE/DE]; Ravensburgstr. 2B, D-8707 Veitshöchheim (DE). NOTERMANS, Servatius, Hubertus, Wilhelmus [NL/NL]; Obrechtlaan 17, NL-3723 KA Bilthoven (NL).</p>			
<p>(74) Anwälte: DAUM, Martin usw. ; Boehringer Mannheim GmbH, Sandhoferstr. 116, D-6800 Mannheim 31 (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: AT (europäisches Patent), AU, BE (europäisches Patent), CA, CH (europäisches Patent), DE (europäisches Patent), DK (europäisches Patent), ES (europäisches Patent), FR (europäisches Patent), GB (europäisches Patent), IT (europäisches Patent), JP, LU (europäisches Patent), NL (europäisches Patent), SE (europäisches Patent), US.</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i></p>			

(54) Title: PROCESS FOR TESTING FOR PATHOGENIC LISTERIA BACTERIA

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG VON PATHOGENEN LISTERIA-BAKTERIEN

(57) Abstract

Nucleic acids which preferably hybridize under hybridization conditions 5-6 x SSC and 42°C-60°C with the 2.5 kb large KpnI-BamHI fragment of pLM63, preferably a nucleic acid listed in Table III, and which contain reporter groups are suitable for hybridization tests on Listeria bacteria. Proteins suitable for producing antibodies against Listeria bacteria are also described.

(57) Zusammenfassung

Nucleinsäuren, welche vorzugsweise bei den Hybridisierungsbedingungen 5-6 x SSC und 42°C-60°C mit dem 2,5 kb großen KpnI-BamHI Fragment aus pLM63, vorzugsweise mit einer Nucleinsäure nach Tabelle III, hybridisieren. Derartige Nucleinsäuren sind, wenn sie Reportergruppen enthalten, für Hybridisierungstests auf Listeria-Bakterien geeignet. Ebenso werden Proteine beschrieben, welche zur Herstellung von Antikörpern gegen Listeria-Bakterien geeignet sind.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT Österreich
AU Australien
BB Barbados
BE Belgien
BF Burkina Fasso
BG Bulgarien
BJ Benin
BR Brasilien
CA Kanada
CF Zentrale Afrikanische Republik
CG Kongo
CH Schweiz
CM Kamerun
DE Deutschland, Bundesrepublik
DK Dänemark

ES Spanien
FI Finnland
FR Frankreich
GA Gabon
GB Vereinigtes Königreich
HU Ungarn
IT Italien
JP Japan
KP Demokratische Volksrepublik Korea
KR Republik Korea
LI Liechtenstein
LK Sri Lanka
LU Luxemburg
MC Monaco
MG Madagaskar

ML Mali
MR Mauritanien
MW Malawi
NL Niederlande
NO Norwegen
RO Rumänien
SD Sudan
SE Schweden
SN Senegal
SU Soviet Union
TD Tschad
TG Togo
US Vereinigte Staaten von Amerika

Verfahren zur Bestimmung von pathogenen Listeria-Bakterien

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von pathogenen Listeria-Bakterien, eine Nachweisnucleinsäure (probe) sowie ein Protein, welches zur Herstellung von Antikörpern gegen pathogene Listeria-Bakterien geeignet ist.

Listerien sind eine heterogene Gruppe grampositiver Bakterien und bestehen im wesentlichen aus den Spezies *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. grayi* und *L. murrayi*. Davon sind lediglich zwei Spezies pathogen, nämlich *L. monocytogenes* für Menschen und Tiere und *L. ivanovii* für Tiere. Die Listeriose äußert sich beim Menschen üblicherweise in einer bakteriellen Meningitis und Septikämie sowie bei Schwangeren in Fehl- und Totgeburten. Bei Schafen und Rindern äußert sich die Listeriose in Fehlgeburt, Enzephalitis, Septikämie und Mastitis (N. Engl. J. Med. 308 (1983), 203-206), J. Infec. 15 (1987), 165-168, Linnan, M.J. et al., An investigation of listeriosis in Southern California 1985, in Courtieu, A.L. et al., (eds) Listeriose, *Listeria*, Listeriosis 1985-1986, University of Nantes).

In jüngster Zeit wurde eine Häufung von Listeriose-Erkrankungen beim Menschen beobachtet, als deren Ursache die Kontamination von Milch und Käse, vor allem von Weichkäsesorten, durch Listeria-Bakterien als Ursache angesehen wird. Demzufolge ist eine Überprüfung von Lebensmitteln auf Listeria-Kontamination wichtig und in USA bereits für Käse vorgeschrieben.

ERSATZBLATT

Aus Int. J. Food Microbiol. 4 (1987), 249-256 ist ein Verfahren zur Bestimmung von *Listeria monocytogenes* bekannt, bei dem der Mikroorganismus selektiv in flüssigem Medium bei 4°C angereichert, auf speziellen Agarböden gezüchtet und anschließend durch eine Vielzahl biochemischer Tests bio- und serotypisiert wird. Dieses Verfahren ist sehr arbeits- und zeitaufwendig und es dauert 14 Tage und länger bis das Endergebnis vorliegt. Außerdem ist die Beurteilung nur sehr schwierig durchführbar und nicht für Routineuntersuchungen geeignet.

Aus Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987), 2256-2259 ist ein Verfahren zur Bestimmung von *Listeria*-Bakterien bekannt, welches durch colony-Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-probes durchgeführt wird. Die colony-Hybridisierung wäre an sich ein geeignetes Verfahren für eine schnelle und einfache Analyse der Kontamination von Lebensmitteln durch *Listeria*-Bakterien. Dazu ist jedoch eine Nachweis-Nucleinsäure (probe) erforderlich, welche mit allen pathogenen *Listeria*-Bakterien (*L. monocytogenes* und *L. ivanovii*), nicht jedoch mit den anderen *Listeria*-Bakterien hybridisiert. Bisher bekannte DNA-probes (Listeriolysin O, β -Listeriolysin; vgl. Infection and Immunity 55 (1987), 3225-3227 und Applied and Environmental, Microbiology 53 (1987), 2256-2259) sind zu unspezifisch und ergeben demzufolge eine nicht akzeptable Anzahl falsch-positiver und falsch-negativer Ergebnisse.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es demnach, eine Nucleinsäure bereitzustellen, mit welcher spezifisch Hybridisierungstests auf pathogene *Listeria*-Bakterien möglich sind sowie hiervon abgeleitete Proteine, welches als Immunogene zur Herstellung von Antikörpern gegen pathogene *Listeria*-Bakterien geeignet sind.

Diese Aufgabe wird durch eine Nucleinsäure gelöst, die bei den Hybridisierungsbedingungen 5 - 6 x SSC und 42 - 60°C mit dem 2,5kb großen KpnI-BamHI Fragment aus dem Plasmid pLM63 (DSM 5220), vorzugsweise innerhalb einer Stunde, hybridisiert. Vorzugsweise ist die Nucleinsäure mindestens 27 Nucleotide lang. Ebenfalls bevorzugt ist eine Nucleinsäure, welche unter diesen Bedingungen mit der in dem oben genannten Fragment enthaltenen Nucleinsäuresequenz gemäß Tabelle III hybridisiert. Ebenfalls bevorzugt ist eine Nucleinsäure, welche unter diesen Bedingungen mit der Nucleinsäure entsprechend Nucleotid 822 - 1890 aus Tabelle III hybridisiert. Besonders bevorzugt wird die Nucleinsäure der Sequenz nach Tabelle III, ein Fragment dieser Sequenz von Nucleotid 1 - 714, 822 - 1890, 935 bis 1244, von 1158 bis 1185 oder von 1209 bis 1718 oder ein mindestens 27 Nucleotide langes Fragment der Sequenz nach Tabelle III verwendet. Die maximale Länge der Probe ist unkritisch. Üblicherweise sollte sie jedoch die Länge des pLM63-Fragments, also 2,5kb, nicht wesentlich überschreiten.

Unter Nucleinsäuren im Sinne der Erfindung sind Oligodesoxyribonukleoside oder die entsprechenden Oligoribonucleoside sowie deren zur Hybridisierung geeignete Derivate zu verstehen.

Der Listeria-Nachweis erfolgt nach den dem Fachmann geläufigen molekularbiologischen Techniken der DNA/DNA, RNA/RNA bzw. RNA/DNA-Hybridisierung zum Nachweis homologer Nucleinsäuresequenzen. Dazu werden üblicherweise die Methoden der colony- oder plaque-Hybridisierung und blotting-Verfahren (z. B. Southern blot und dot blot) verwendet. Weitere bekannte Verfahren sind in USP 4 358 535, Gene 21 (1983) 7785, EP-B 130515, EP-B 70685, EP-B 70687 und EP-A 238332 beschrieben.

Die Markierung der Probe erfolgt beispielsweise mit radioaktiv derivatisierten Desoxyribonucleosidtriphosphaten, nicht-radioaktiv mit Biotin, Avidin, Streptavidin, einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Hapten. In letzterem Fall erfolgt der Nachweis des Hybridisierungsprodukts durch Bestimmung der enzymatischen Aktivität des Markerenzymes in einem Anti-Hapten-Antikörper-Enzym-Konjugat über gekoppelte Farbstoffsysteme. Weitere Verfahren sind beispielsweise in der DE-A 38 13 278 und der DE-A 38 00 644 beschrieben. Die Substanz, mit der die Probe markiert ist, wird dort auch als Reportergruppe bezeichnet.

Die Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt vorzugsweise dadurch, daß die erfindungsgemäßen Nucleinsäureprobe radioaktiv, mit Biotin, Streptavidin, Avidin oder mit einem Hapten markiert und anschließend Hybridisierung und Bestimmung der Markierung durchgeführt wird.

Zur Markierung der erfindungsgemäßen Probes können verschiedene Methoden angewendet werden, wie sie beispielsweise in Molecular Cloning, Maniatis et al (1982), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, beschrieben sind. Der Einbau vom Biotin in Nucleinsäuren ist beispielsweise in PNAS USA 78 (1981) 6633 und PNAS USA 79 (1982) 7331 beschrieben. Eine weitere Methode zum Einbau von Reportergruppen ist in EP-A 292128 beschrieben.

Die radioaktive Markierung kann nach den bekannten Verfahren durchgeführt werden. Der Einbau eines Haptens kann beispielsweise enzymatisch, chemisch oder photochemisch erfolgen. Die Herstellung der Oligonucleotid-probes kann beispielsweise nach der "Random-primed" Methode (Anal. Biochem. 132 (1983) 6) der "Specific-primed" Methode, der "Reversen transcriptions" Methode (Stelow, J.K. und Holländer A. eds, Genetic Engineering, Plenum Press New York and London, Vol. 1, Seite 1) nach der "Fill in" der "Nick-Translation" Methode (J. Mol. Biol. 113 (1977) 237) der "Tailing" Methode, der "Transcriptions" Methode (J. Mol. Biol. 166 (1983) 477), der photochemischen Methode (Nucl. Acids Ris. 13 (1985) 745 - 761) oder chemisch durchgeführt werden. Diese Methoden sind beispielsweise in der DE-A 38 13 278 näher beschrieben.

Das zu untersuchende Material (sample) wird vor Durchführung der Bestimmung in üblicher Weise aufbereitet. Vorteilhaft wird dabei die RNA und/oder DNA aus der sample nach bekannten Verfahren isoliert (vgl. z. B. Maniatis, Molecular Cloning (1982) 280 - 281).

Vor Durchführung der Bestimmung können die Nucleinsäuren der sample in kürzerkettige Fragmente gespalten werden. Dies kann beispielsweise durch Ultraschallbehandlung, Mikrowellenbehandlung oder Behandlung mit Restriktionsendonukleasen geschehen. Falls die samples doppelsträngige Nucleinsäuren enthalten, müssen diese vor Durchführung der Bestimmung in Einzelstränge gespalten werden. Dies kann nach den dem Fachmann geläufigen Methoden durch Denaturierung (z.B. Hitzebehandlung oder alkalische Behandlung) erfolgen.

Die derivatisierte oder radioaktiv markierte Nucleinsäureprobe wird mit einer auf einen Träger gebundenen denaturierten DNA oder RNA der zu untersuchenden sample in Kontakt gebracht und hierbei Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert, Puffer und sonstige Bedingungen, abhängig von der Länge der Nucleinsäureprobe und der daraus resultierenden Schmelztemperatur des zu erwartenden Hybrids so gewählt, daß die markierte Nucleinsäure an homologe Nucleinsäuren binden kann (J. Mol. Biol. 98 (1975), 503, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979) 368 3). Besonders geeignete Hybridisierungsbedingungen sind 5-6 x SSC bei 42°C - 60°C und eine Inkubationsdauer von 1 bis 20 Stunden, vorzugsweise 1 Stunde. Besonders geeignete Waschbedingungen sind 0,1 - 0,5 x SSC bei 65°C - 70°C und eine Inkubationsdauer von 15 Minuten bis zwei Stunden, vorzugsweise 30 Minuten. Zur Durchführung der Bestimmung ist es jedoch auch möglich, andere Bedingungen zu wählen, da die optimalen Bedingungen von der Art und Konzentration der probe und der zu bestimmenden Nucleinsäure abhängig sind. So kann beispielsweise durch Zusatz von 40 % Formamid eine niedrigere Hybridisierungstemperatur verwendet werden. Ebenso kann ein organisches Lösungsmittel in einer Konzentration bis zu 50%, vorzugsweise 20-50%, zugesetzt werden. Geeignete Hybridisierungsbedingungen lassen sich, wie in Anal. Biochem. 178(1984) 267, beschrieben, aus Länge der probe, Salzgehalt des Reagenzes, GC-Gehalt der probe und Temperatur berechnen. Als besonders geeignete Bedingungen haben sich erwiesen:

GC-Gehalt der probe 43% - 60%,
Länge der probe mindestens 27 Nucleotide,
Hybridisierung bei 42°C - 60°C und
bei 5 - 6 x SSC über 1 Stunde,
waschen bei 65°C - 70°C und
bei 0,1 - 0,5 x SSC über 30 Minuten,
ggf. unter Zusatz von
40% bis 50% Denaturierungsmittel (z. B. Formamid)
während der Hybridisierung

Unter 1 x SSC ist eine wäßrige Lösung zu verstehen aus

0,15 mol/l NaCl
0,015 mol/l Na₃Citrat x 2 H₂O,

welche mit 1 mol/l HCl auf pH 7 eingestellt ist. Angaben wie 0,1 x SSC sind entsprechende Verdünnung dieser Lösung.

Als Träger geeignet sind Membranen oder Trägermaterialien auf Basis Nitrocellulose (z.B. Schleicher und Schüll BA85, Amersham Hybond C), verstärkte oder gebundene pulverförmige Nitrocellulose oder mit verschiedenen funktionellen Gruppen (z.B. Nitrogruppe) derivatisierte Nylonmembranen (z.B. Schleicher und Schüll Nytran, NEN Gene Screen, Amersham Hybond N, Pall Biodyne). Vor Durchführung der Bestimmung wird der Träger vorzugsweise vorbehandelt, um nichtspezifische Bindungen der probes an den Träger zu verhindern. Für diese Vorhybridisierung geeignete Blockierungssubstanzen sind beispielsweise phosphate buffered saline mit Rinderse- rumalbumin, nichtionische Detergentien, Polyanionen und DNA aus Heringssperma. Nitrozellulosefilter und Nylonmembranen werden vorzugsweise mit 5 x SSC bei 65°C 1 Stunde vorbehan- delt.

Nach Durchführung der Inkubation wird der Träger gewaschen, um unhybridisierte Nucleinsäuren zu entfernen. Dies kann beispielsweise erfolgen durch eine Lösung von 0,1 - 1 % (v/v) eines ionischen Detergenz, ggf. unter Zusatz von Salz (z. B. Natriumchlorid oder Natriumcitrat) oder mit SSC, vorzugsweise 0,1 - 0,5 x SSC.

Bei Verwendung von radioaktiv markierten probes wird eine Autoradiographie durchgeführt.

Bei Verwendung von Hapten-markierten Probes wird mit einem Antikörper oder Antikörperfragment gegen das Hapten inkubiert. Der Antikörper trägt hierbei eine Markierung, beispielsweise eine radioaktive oder enzymatische Markierung. Nach der Antikörper-Inkubation wird nochmals gewaschen, um nur spezifisch gebundene Antikörper-Konjugate nachzuweisen. Die Bestimmung erfolgt dann über die Markierung des Antikörpers oder des Antikörperfragments nach den an sich bekannten Methoden. Entsprechendes gilt für eine Biotin- oder Avidin-markierung.

Die Markierung des Anti-Hapten-Antikörpers oder des Antikörper-Fragments erfolgt in an sich bekannter Weise. Geeignet sind z. B. Enzymmarkierung, radioaktive Markierung, (Bio)Lumineszenz-Markierung oder Fluoreszenzmarkierung. Bevorzugt wird jedoch eine Enzymmarkierung mit Enzymen, wie alkalische Phosphatase, Peroxidase oder β -Glactosidase verwendet. Besonders bevorzugt wird als Markierungsenzym alkalische Phosphatase verwendet. Die Bestimmung der alkalischen Phosphatase erfolgt über Leukosysteme, insbesondere über indigoide Systeme als oxidierbare Verbindungen (vgl. EP-A 0228663). Als Oxidationsmittel dienen Tetrazoliumsalze. Bei dem Markierungsenzym alkalische Phosphatase wird als Redoxsystem bevorzugt X-Phosphat/Nitroblau-Tetrazolium eingesetzt (F.P. Altmann, Tetrazoliumsalts and Formazans, Progr. Histochem. Cytochem. vol. 913 (1976), Gustav-Fischer-Verlag Stuttgart, Seite.1). Unter X-Phosphat ist hierbei 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat und unter Nitroblau-Tetrazolium 3,3'-(3,3'-Dimethoxy-4,4'-biphenyl)-bis-5-phenyl-2-(4-nitrophenyl)-tetrazoliumchlorid zu verstehen. Alkalische Phosphatase spaltet das chromogene Substrat (X-Phosphat), das durch die Abspaltung des Phosphats und Oxidation ein blaues, schwerlösliches Dimäres bildet, welches gleichzeitig die Tetrazoliumverbindung zu einem ebenfalls blauen, schwerlöslichen Formazan reduziert wird.

Der Nachweis der anderen geeigneten Markierungssysteme wird nach an sich bekannten Methoden durchgeführt.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Reagenz zur Bestimmung von Listeriosis, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß es eine markierte Nucleinsäure, die mindestens eine Länge von 27 Nucleotiden hat und bei 5 - 6 x SSC und 42°C - 60°C mit dem 2,5kb großen KpnI-BamHI Fragment aus dem Plasmid pLM63 (DSM 5220) hybridisiert. Bevorzugt ist ein Reagenz, welches eine markierte Nucleinsäure enthält, welche mit einer Nucleinsäure gemäß Tabelle III unter den oben genannten Bedingungen hybridisiert. Weiter bevorzugt ist ein Reagenz, welches eine markierte Nucleinsäure enthält, welche mit einer Nucleinsäure entsprechend den Nucleotiden 822 - 1890 aus Tabelle III unter den oben genannten Bedingungen hybridisiert. Vorzugsweise beträgt die Hybridisierungsdauer 1 - 20 Stunden, besonders bevorzugt 1 Stunde. Außerdem enthält das Reagenz ein Detektionssystem für die Markierung. Zur Markierung können die oben beschriebenen Verfahren verwendet werden.

Vorzugsweise wird eine markierte Nucleinsäure entsprechend der Sequenz von Tabelle III oder entsprechend den Nucleotiden 1 - 714, 822 - 1890, 935 bis 1244, 1158 bis 1185 oder 1209 bis 1718 verwendet.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Protein, welches zu mindestens 80 % homolog zu der in Tabelle III angegebenen Aminosäuresequenz Protein I, Protein II oder Protein III ist. Bevorzugt ist ein Protein, welches zu mindestens 80% homolog zu Protein II ist. Dieses Protein hat ein Molekulargewicht von 18 kD. Die Proteine sind dazu geeignet, Antikörper gegen Listeria herzustellen. Bevorzugt sind die Proteine mit der Aminosäuresequenz gemäß Tabelle III oder den Teilsequenzen Protein I, Protein II oder Protein III. Besonders bevorzugt ist Protein II.

Mit dem gegebenenfalls modifizierten erfindungsgemäßen Protein lassen sich durch Immunisierung von Versuchstieren, Gewinnung von Antiserum und Reinigung der Antikörper nach ansich bekannten Verfahren Antikörper und Antiseren gegen pathogene Listeria-Bakterien erhalten. Monoklonale Antikörper können erhalten werden durch Immunisierung von Versuchstieren mit gegebenenfalls modifiziertem erfindungsgemäßen Protein, Fusion von B-Lymphozyten der so erhaltenen immunisierten Tiere mit transformierenden Agentien, Klonierung und Kultivierung der so gebildeten Hybridzellen, welche den monoklonalen Antikörper produzieren und Isolierung des letzteren. Besonders geeignete Tiere für die Herstellung der Antikörper sind Ratten und Mäuse. Geeignete Modifizierungsmittel sind beispielsweise N-Bromsuccinimid (NBS) unter Oxidation von Tryptophangruppen am Protein (BBA 143 (1967) 462-472) Carboximethylierung mit Jodacetat (IAA) die hauptsächlich am Histidin angreift bzw. Nitrierung mit Tetranitromethan (TNM) (J.Biol.Chem. 238 (1963) 3307) sowie die Azotierung mit diazotierter Sulfanilsäure (Meth. Enzymol. 25 (1972) 515-531). Besonders geeignete Versuchstiere sind Balb/c-Mäuse oder AJ-Mäuse.

Die Immunisierung erfolgt durch übliche Verabreichung des nativen oder modifizierten Enzyms, vorzugsweise in Kombination mit Adjuvans. Bevorzugt wird als Adjuvans Freund'sches Adjuvans oder Aluminiumhydroxid zusammen mit Bordetella pertussis verwendet. Die Immunisierung erfolgt üblicherweise über mindestens 2, vorzugsweise 4 Monate.

Zur Gewinnung monoklonaler Antikörper werden nach erfolgter Immunisierung die B-Lymphozyten der immunisierten Tiere nach üblichen Methoden mit transformierenden Agentien fusioniert. Beispiele für transformierende Agentien, die im Rahmen der Erfindung verwendet werden, sind Myelomazellen, transformierende Viren, wie z. B. Epstein-Barr Virus oder die in der DE-A 32 45 665 beschriebenen Agentien. Die Fusionierung erfolgt nach dem bekannten Verfahren von Köhler und Milstein (Nature 256 (1975) 495-497). Die hierbei gebildeten Hybridzellen werden in üblicher Weise kloniert, z. B. unter Verwendung eines handelsüblichen Zellsorters und die erhaltenen Klone, welche den gewünschten monoklonalen Antikörper bilden, gezüchtet. Die Herstellung und Selektion von monoklonalen Antikörpern ist beispielsweise in J. Immunol. Meth., 39 (1980) 285-308 ausführlich beschrieben.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein immunologisches Verfahren, zur Bestimmung von Listeria-Bakterien, bei dem mindestens ein ggf. monoklonaler oder polyklonaler Antikörper gegen das erfindungsgemäße Protein verwendet wird. Als immunologische Bestimmungsmethoden eignen sich im Prinzip alle gängigen Immuno-assays, wie z.B. Radio-Immunoassay, Enzym-Immunoassay, Floureszenz-Immunoassay u.s.w.. Ferner sind sämtliche Verfahrensvarianten, wie z.B. kompetitiver Immuno-assay JEMA-Verfahren anwendbar. Zur Markierung eignen sich die für die jeweilige Bestimmungsmethode üblichen Mittel. So werden bei einem Radio-Immunoassay Radio-Isotope, beispielsweise ^{125}I , zur Markierung verwendet. Für einen Enzym-Immunoassay sind sämtliche hierfür üblicherweise eingesetzten Enzyme, beispielsweise Peroxidase oder β -Galactosidase, geeignet. Für eine Floureszenz-Immunoassay sind die üblichen floureszierenden Gruppen als Markierung brauchbar. Einzelheiten dieser verschiedenen Testmethoden und Verfahrensvarianten sind dem Fachmann bekannt.

In dem Bestimmungsverfahren können die monoklonalen oder polyklonalen Antikörper als solche oder Fragmente hiervon, welche die entsprechenden immunologischen Eigenschaften aufweisen, beispielsweise Fab-Fragmente, verwendet werden.

Die folgenden Beispiele und die Abbildungen erläutern die Erfindung weiter. Sofern nichts anderes vermerkt, sind alle Prozentangaben Gewichtsprozentangaben. Tabelle III zeigt die DNA-Sequenzen von dth 18 (Nucleotid 822 - 1890) und eines bevorzugten Ausschnittes aus dem 2,5 kb großen KpnI-BamHI Fragment von Plasmid pLM63 (Nucleotid 1 - 1890) sowie die Aminosäuresequenzen der Proteine I, II und III einschließlich Startcodon.

Beispiel 1

Markierung der DNA-probes

200 ng der isolierten DNA werden ^{32}P -markiert, wie in Anal. Biochem. 132 (1983), 6-13 beschrieben.

ERSATZBLATT

Beispiel 2

Probenvorbereitung

2.1 Mikroorganismen

Die verwendeten Referenzstämme sind in Tab. Ia aufgelistet. Alle anderen Listeria-Stämme (Tabellen Ib, II) wurden aus einer Sammlung von etwa 3000 Listeria-Stämmen des National Institute of Public Health and Environmental Protection, Bilthoven, ausgewählt. Unter den geprüften Stämmen befinden sich 40 Stämme, die von an Listeriose erkrankten Patienten stammen. Diese Stämme wurden, wie in Zbl. Bact. I Abt. Orig. A 246 (1980), 211 - 227 beschrieben, isoliert. Die Mikroorganismen wurden in einem flüssigen Selektions- und Anreicherungsmedium (pH 7,0 1g/l Pepton, 8,5g/l NaCl, 10µg/ml, Trypaflavin-HCl, 10µg/ml Nalidixinsäure, 50µg/ml Cyclohexamid) über 24 Stunden bei 30°C gezüchtet und anschließend auf Spezialnährboden (Anreicherungsmedium + 1% Agar) ausplattiert. Nach Bebrütung bei 30 °C über 24 Stunden werden diese Platten direkt in dem Hybridisierungstest eingesetzt.

2.2 Anderes Probenmaterial

Als weiteres Probenmaterial wird eingesetzt Cerbrospinalflüssigkeit, faeces, Blut, Lochia, Gehirnmaterial, Leber, Cervixmaterial, Amnionfluid, Lebensmittel, Silagegras und Tiermaterial. Von diesem Material werden 20 g in 250 ml phosphate buffered saline suspendiert, homogenisiert und weiter aufgearbeitet, wie in International Journal of Food Microbiology 4 (1987), 249 - 256 beschrieben. 0,1 ml der Probe werden auf nichtselektive Agarplatten (85 mm Durchmesser) ausplattiert und über Nacht inkubiert.

2.3 Durchführung eines Hybridisierungstests mit einer DNA-probe (dth 18, 1069 Nucleotide oder pLM63, 1890 Nucleotide, Tabelle III)

Von den nach 2.1 bzw. 2.2 hergestellten Platten wird mit Nylonmembranen (Gene Screen plus membranes^R, DuPont Corp., USP 4,455,370) ein Abklatsch hergestellt. Die Membranen werden auf Filterpapier gelegt, welches mit 0,5 mol/l NaOH getränkt ist und für 5 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert. Anschließend werden die Membranen auf Filterpapier gebracht, welches mit 1 ml frischer 0,5 mol/l NaOH getränkt ist und mit 1 ml 1 mol/l Trispuffer (pH 7,5) neutralisiert. Dieser Neutralisationsschritt wird wiederholt. Die Membranen werden in 100 ml 5 x SSC getaucht und dabei mit einem Tuch die Zellreste abgerieben. Nach Lufttrocknung werden die Membranen über 6 - 16 Stunden bei 40°C mit 15 ml Lösung A vorhybridisiert. Anschließend wird die DNA-probe dth 18 oder pLM63 (0,05 µg in 2,5 ml, 5 x SSC) zugegeben bei 60°C für 18 Stunden inkubiert. Anschließend wird 45 min mit 0,2 x SSC, welches zusätzlich 1% SDS und 0,1 % Natriumpyrophosphat enthält, im Wasserbad bei 65°C gewaschen.

Nach Trocknung werden die Membranen in Plastikfolie eingeschweißt und damit bei -70°C über 18 Stunden ein Röntgenfilm belichtet.

2.4 Hybridisierung mit einer 314bp DNA-probe

Hybridisierungstests werden mit einer verkürzten probe (Nucleotid 1209 - 1718 (vgl. Tabelle III) durchgeführt. Die Hybridisierungsbedingungen sind 5 x SSC bei 42°C (1 Stunde) und anschließendes Waschen in 0,2 x SSC bei 70°C (30 Minuten). zu sehen. Es zeigt sich, daß auch diese probe als DNA-probe zur Prüfung auf Listeriose geeignet ist.

ERSATZBLATT

Reagentien:

1 x SSC: 0,15 mol/l NaCl und 0,015 mol/l Natriumcitrat

Lösung A:

50 mmol/l Trispuffer, pH 7,5,

10 mmol/l EDTA

1 mol/l NaCl

0,2 % Ficoll

0,2 % Polyvinylpyrrolidon

0,2 % Rinderserumalbumin

1 mg/ml denaturierte Heringssperma-DNA

1 % Natriumpyrophosphat und

10 % SDS (Natriumdodecylsulfat).

Zur weiteren Überprüfung wurde noch mit weniger stringenten Bedingungen (2 x SSC bei 65°C) gearbeitet. Dabei ergaben sich analoge Ergebnisse.

Beispiel 3

Vergleichsversuche mit einer DNA-probe nach dem Stand der Technik (Listerolysin 0)

Es wurde als probe ein synthetisches 19 mer-oligomer (5' GATCACTCTGGAGGATACG 3') verwendet (analog Infection and Immunity (56 (1988), 766 - 772)

200 ng dieser DNA-Probe wurde am 5'-Ende mit ^{32}P -markiert, wie in Maxam und Gilbert (Meth. Enzymol. 65 (1980, 499) beschrieben.

Die Hybridisierungsbedingungen waren:

6 x SSC bei 37°C, dreimaliges Waschen mit 6 x SSC, enthaltend 1 % SDS und 0,1 % Natriumpyrophosphat für jeweils 30 min bei 40°C.

Beispiel 4**Biotypisierung der verwendeten Mikroorganismen**

Die Biotypisierung wurde, wie in An. Inv. Pasteur/ Microbiol. 134 (1983) 56 - 71 beschrieben, durchgeführt. Die Stämme wurden in 4 ml halbfestem Peptonagarmedium, welches 1 % D-Xylose oder L-Ramnose enthält, zwei Tage bei 37°C angezogen. Das Peptonmedium besteht aus 10 g Bacto-Pepton, 5 g Natriumchlorid, 5,5 Oxoidagar L 28 und 0,08 g Bromthymolblau aufgelöst in 1000 ml destilliertem Wasser, pH 7,8, autoklaviert bei 120°C für 15 min. Nach Autoklavieren wird filtersterilisierte Zuckerlösung zugegeben bis zu einer Endkonzentration von 1 %. Zur Biotypisierung wurde die Hämolysinproduktion geprüft durch Züchtung der Stämme über Nacht bei 37°C in Brain Heart-Infusionsbrühe. Von dieser Kultur werden 0,2 ml entnommen und mit 0,2 ml einer 2 %igen Schaferythrozytensuspension in PBS (Phosphat buffered saline), welche dreimal gewaschen wurde, zugegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wird auf Hämolyse geprüft. L. monocytogenes, NCTC7973 und L. innocua, NCTC11289 dienten als positive und negative Kontrollen.

Die Biotypisierung erfolgt nach Zbl. Bakt. Mikrobiol. Hyg. I Abt. Orig. A 259 (1985) 341 - 350.

Beispiel 5

Serotypisierung

Die Serotypisierung wurde, wie in Seeliger und Höhne (Zbl. Bact. Microbiol. Hyg. I Abt. Orig. A, 259 (1985), 341-350 beschrieben, durchgeführt.

Die Stämme wurden in 4 ml Tryptophosphat-Brühe, welche mit 1 % Glucose angereichert ist, angezüchtet und im Wasserbad bei 37°C für 6 - 7 Stunden geschüttelt. Mit dieser Kultur wird eine Tryptoseagarplatte inkuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Parallel wird ein zweites Röhrchen mit Tryptosephosphat-Brühe, welcher 1 % Glucose zugegeben wird, inkuliert und bei 25°C unter Schütteln über Nacht im Wasserbad inkubiert. Die Tryptosephosphat-Platte wird mit 5 ml phosphate buffered saline, pH 7,4 geerntet, eine Stunde im kochenden Wasserbad erhitzt und anschließend zentrifugiert.

Die Zellen werden resuspendiert und auf eine Konzentration von 5×10^8 Zellen/ml eingestellt (1×10^9 Zellen/ml haben eine OD von 1,0 bei 600 nm). Von dieser Suspension werden 0,2 ml entnommen und zu 0,2 ml 75fach verdünntem Antiserum gegen die Polysaccharid-Antigene I, II, V, VI, VIII und IX im Glasröhrchen gegeben und bei 45°C für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wird abgekühlt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend werden die Röhrchen auf sichtbare Agglutination geprüft.

Die Serotypisierung erfolgt, wie in Bergeys Manual of Bacteriology (N.R.Kreig, J.G.Holt (eds) Bergeys Manual of Systematic Bacteriology (1984), Williams and Wilkins, Baltimore and London) näher beschrieben. Es wurde in die Serotypenklassen 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4b, 4d, 4a/b, 5, 6b und 7 eingeteilt.

Beispiel 6

Maus-Bioassay

Zur Überprüfung, ob ein Listeriosis-Stamm pathogen ist, wird ein Maus-Bioassay durchgeführt, wie in Infect. Immun. 45 (1984), 234 - 241 beschrieben, durchgeführt. Dazu werden 10^4 - 10^5 Bakterien in 200 μ l phosphate buffered saline pH 7,4 intravenös in die Maus injiziert. Nach 2 - 4 Tagen werden die Mäuse getötet und die Milz entnommen. Als pathogen wird ein Stamm dann bezeichnet, wenn die Anzahl der Bakterien, die in der gesamten Milz gefunden werden, 10^4 übersteigt.

Beispiel 7

Herstellung von Listeria Antikörpern

50 μ g des gereinigten Antigens (Aminosäuresequenz Tabelle III) werden in complete Freund'schem Adjuvans intramuskulär (IM) injiziert. Drei Wochen, 30 und 40 Tage später wird die Injektion wiederholt. 10 Tage nach der letzten Injektion wird Antiserum gewonnen und affinitätschromatographisch gereinigt.

Mit diesem Antiserum kann ein Immunoblot zur Bestimmung von Listeria durchgeführt werden.

Beispiel 8

Überprüfung der Eignung einer Probe für eine Listeria-Bestimmung

Mit einem Plasmid auf Basis von pUC18, welches die DNA-Sequenz nach Tabelle III insertiert enthält, werden E.coli HB 101 (DSM 1607) transformiert und in Gegenwart von 50 µg/ml Ampicillin, bis zu einer optischen Dichte von OD 600nm = 1 über Nacht gezüchtet. 0,1 ml dieser Kulturbrühe werden aus Agarplatten, die 50µg/ml Ampicillin enthalten (85 mm Durchmesser) ausplattiert und über Nacht inkubiert.

Von den so hergestellten Platten wird mit Nylonmembranen (Gene Screen Plus-Membranes®, DuPont) ein Abklatsch hergestellt.

Die Membranen werden auf Filterpapier gelegt, welches mit 0,5 mol/l NaOH getränkt ist und für 5 Minuten im kochenden Wasserbad inkubiert. Anschließend werden die Membranen auf Filterpapier gebracht, welches mit 1 ml frischer 0,5 mol/l NaOH getränkt ist und mit 1 ml 1 mol/l Trispuffer, pH 7,5, neutralisiert. Dieser Neutralisationsschritt wird wiederholt. Die Membranen werden in 100 ml 5 x SSC getaucht und dabei mit einem Tuch die Zellreste abgerieben. Nach Lufttrocknung werden die Membranen über 6 - 16 Stunden bei 40°C mit 15 ml Lösung A vorhybridisiert. Anschließend wird die auf Eignung zu überprüfende DNA-probe (0,05 µg in 2,5 ml) zugegeben und bei 60°C für 18 Stunden inkubiert. Anschließend wird 45 Minuten in 0,2 x SSC, welches zusätzlich 1 % SDS und 0,1 % Natriumpyrophosphat enthält, im Wasserbad bei 65°C gewaschen. Nach Trocknung werden die Membranen in Plastikfolien eingeschweißt und damit bei minus 70°C über 18 Stunden ein Röntgenfilm belichtet. Wenn auf dem Röntgenfilm Signale ersichtlich sind, die von einer Hybridisierung stammen, ist diese Probe zur Verwendung im Listeriosistest geeignet. Analoge Ergebnisse werden erhalten, wenn als Plasmid pLM63 (DSM 5220) verwendet wird.

Beispiel 9

Vergleich der Hybridisierung einer erfindungsgemäßen probe und einer Vergleichsprobe (vgl. Beispiel 3) mit verschiedenen Listeriosis-Stämmen. Die Hybridisierung wurde wie in Beispiel 2 und 3 beschrieben durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen Tabelle I und II.

Tabelle I

Vergleich der Hybridisierung einer erfindungsgemäßen DNA-probe (1) (935bp bis 1244bp von Tabelle III) und einer DNA-probe nach dem Stand der Technik (Listeriolysin O, (2), hergestellt nach Beispiel 3) mit DNA aus Listeria-Stämmen.

Analoge Ergebnisse werden mit Nucleotid 1 - 714 als DNA-Probe (1) erzielt. Zusätzlich hybridisiert diese Probe noch mit DNA aus Listeria monocytogenes Stämmen des Serotyps 4a (z.B. NCTC 5214).

Tabelle Ia:
mit Referenzstämmen

Sero- typ	Stamm-Nr. ¹⁾	Biotyp	probe	
			1	2
1/2 a	NCTC7973	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
1/2 b	SLCC2755	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
	SLCC3954	<u>L.seeligeri</u>	-	-
1/2 c	NCTC5348	<u>L.monocytogenes</u>	+	+

ERSATZBLATT

Sero- typ	Stamm-Nr.	Biotyp	probe	
			1	2
3 a	NCTC5105	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
3 b	SLCC2540	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
3 c	SLCC2479	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
4 b	NCTC10527	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
4 c	ATCC19116	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
4 d	NCTC10888	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
4 e	ATCC19118	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
4 ab	NCTC10528	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
5	ATCC19119	<u>L.ivanovii</u>	+	-
6 a	SLCC 5334	<u>L.welshimeri</u>	-	-
	NCTC11288	<u>L.innocua</u>	-	-
6 b	NCTC11289	<u>L.innocua</u>	-	-
7	SLCC 2482	<u>L.monocytogenes</u>	+	+
	RIVM 1	<u>L.gravi</u>	-	+
	RIVM 2	<u>L.murravi</u>	-	+

1) Hinterlegungstellen vgl. World Directory of
 Collections of Cultures of Microorganisms edited by V.F.
 McGowan and V.B.D. Sherman, World Data Center, Universi-
 ty of Queensland, Australien, 1982.

Tabelle I b:
mit einer Vielzahl von Stämmen

Anzahl der untersuch- ten Stämme	Biotyp	probe	
		1	2
34	<u>L.monocytogenes</u> (34)	34	34
39	<u>L.monocytogenes</u> (37)	37	37
	<u>L.seeligeri</u> (1)	0	0
	<u>L.welshimeri</u> (1)	0	0
16	<u>L.monocytogenes</u> (16)	16	16
5	<u>L.monocytogenes</u> (5)	5	5
5	<u>L.monocytogenes</u> (3)	3	3
	<u>L.welshimeri</u> (1)	0	0
	<u>L.seeligeri</u> (1)	0	0
2	<u>L.monocytogenes</u> (1)	1	1
	<u>L.innocua</u> (1)	0	0
77	<u>L.monocytogenes</u> (77)	76	76

- 23 -

Anzahl der untersuch- ten Stämme	Biotyp	probe	
		1	2
5	<u>L.seeligeri</u> (5)	0	0
2	<u>L.monocytogenes</u> (2)	2	2
1	<u>L.mcnocytogenes</u> (1)	1	1
34	<u>L.innocua</u> (32)	0	1
	<u>L.welshimeri</u> (2)	0	0
23	<u>L.innocua</u> (18)	0	2
	<u>L.welshimeri</u> (5)	0	0
7	<u>L.monocytogenes</u> (7)	7	7
2	<u>L.grayi</u> (2)	0	2
3	<u>L.murrayi</u> (3)	0	3

Tabelle II

Tabelle II zeigt die Hybridisierungsreaktion von probe 1 mit verschiedenen Listeria-Stämmen, deren Pathogenität nach Beispiel 6 bestimmt wurde.

Biotyp	Sero- typ	Herkunft	Hybridis- ierung	<u>log Anzahl/g Milz</u>
			2. Tag	4. Tag
<u>L.monocytogenes</u> 1/2 a		Referenz- stamm	+	7.4 ^{c)} 8.3 +
<u>L.monocytogenes</u> 1/2 b		Weich- käse	+	6.2 7.1 +
<u>L.monocytogenes</u> 1/2 c		Lebens- mittel	+	5.4 + +
<u>L.monocytogenes</u> 3 a		Lebens- mittel	+	6.4 6.5
<u>L.monocytogenes</u> 3 b		Lebens- mittel	+	8.4 + +
<u>L.monocytogenes</u> 3 c		Lebens- mittel	+	8.2 + +
<u>L.monocytogenes</u> 4 b		Weich- käse	+	7.0 + +
<u>L.monocytogenes</u> 4 b		Weich- käse	+	6.5 + +
<u>L.monocytogenes</u> 4 b		Weich- käse	+	8.3 + +
<u>L.seeligeri</u>	4 c	Lebens- mittel	-	<2.0 <2.0

Biotyp	Sero- typ	Herkunft	Hybridis- ierung	<u>log Anzahl/g Milz</u>	
				2. Tag	4. Tag
<u>L.innocua</u>	6 a	Weich- käse	-	2.0	3.7
<u>L.innocua</u>	6 b	Weich- käse	-	<2.0	<2.0
<u>L.grayi</u>		Referenz- stamm	-	<2.0	<2.0
<u>L.murrayi</u>		Referenz- stamm	-	<2.0	<2.0

a) 10^4 - 10^5 Organismen wurden 4 Mäusen injiziert.
 b) Hybridisierung wird mit dem dth 18-gene als probe durchgeführt (vgl. Beispiel 2.3).c) Mittelwert von 2 Mäusen;
 +: Maus vor Probenahme gestorben.

Tabelle III

NUCLEOTIDE SEQUENCE OF PLASMID pPLM63

10 20 30 40 50 60
 CTTTTCATTTAGATAAAAACAAAAGAAGAAATTGGCGCTTACCTGCTTCGGCGATTGAAT
 PheHisLeuAspLysThrLysGluGluIleGlyAlaLeuProAlaSerAlaIleGluCys

 70 80 90 100 110 120
 GTCAGTATGAGGCTTTGTGATTAATGAAGCCAATAATTAAGGAGTGATAAAATGCAGGT
 GlnTyrGluAlaPheValIleAsnGluAlaAsnAsn---
 METGlnVal
 ↓ Protein III
 130 140 150 160 170 180
 TTTAGTTTACCAAGAAAATAAGGATATCAATTATATAAAAAACGGTCCAAGAAGTAAAACG
 LeuValLeuProGluAsnLysAspIleAsnTyrIleLysThrValGlnGluValLysArg

 190 200 210 220 230 240
 ATTTTTTGC GGATTGGAGCGGTTTCGGATGATTACGGGGTTATCAAAAAAGCCACATTT
 PhePheAlaAspPheGluArgPheArgMETIleThrGlyLeuSerLysLysProHisLeu

 250 260 270 280 290 300
 ACTTAGAAATGGTTTCTGGAAAGAGCCGAGTTGAGCCGGTAGCATTCTGCTAGACA
 LeuArgAsnGlyPheLeuGluGluProGlnPheGluProValAlaPheSerAlaArgHis

 310 320 330 340 350 360
 TAATAAGAAGTCATTTGGAAAGAGCGCGATGGTTGGTAGAGAAATATACTGAAATGTTGAA
 AsnLysGluValIleLeuGluAlaArgTrpLeuValGluLysTyrThrGluMETLeuAsn

 370 380 390 400 410 420
 TCAGATGGATGATTATATCGAACTATTTGATGGAATGTTACGTGGAACGAAAACAAGA
 GlnMETAspAspLeuTyrArgThrIleLeuMETGluCysTyrValGluArgLysGlnAsp

 430 440 450 460 470 480
 TGTGGCGGTAAATGATGGATTACCGTATGAAATTGCCAGTTAAACGGATAAAAAAACG
 ValAlaValMETMETAspLeuProTyrGluIleAlaGlnPheLysArgIleLysLysArg

 490 500 510 520 530 540
 GGCAGTGCTAGAACTTGCAACGCTAATGGGGATTTAGTAAGGAAATGATGATACTTCG
 AlaValLeuGluLeuAlaThrLeuMETGlyIleLeuValArgLys---
 → Protein III

ERSATZBLATT

Tabelle III (Forts.)

550 560 570 580 590 600
 TGATATTTGAAACATCATTTCCTATTAATATAGAAGTAAGCTAATTGTCCAGTAAGCG
 610 620 630 640 650 660
 GATGACAATAAAAGCTGCATCAGAATGAAGGTGCACCGATTCTGATAATACATGATGT
 670 680 690 700 710 720
 TTTACAAGGAATTGTTTATGATTGGATTAAATCCGTTGAGATAAACAAATATTCTA
 730 740 750 760 770 780
 TTTTGGAAAGTAAAGTCGGAGGAATAAATTAAATGTGGTCTTGACCGAACCTTGCT
 790 800 810 820 830 840
 TTCTGTTTAAAGGAGTGAACGTTGGTGAAGAGTTGAGCTTCATGAGAGTTGGAAG
 ValLysSerLeuSerPheMETArgValLeuGluAla
 ↓
 Protein I
 850 860 870 880 890 900
 CAGTGAGAACAAATGCTCCAGGAAAAAGGCAGACTAGATATTCTATTGTAATGCGTGACC
 ValArgThrMETLeuGlnGluLysGlyGlyLeuAspIleSerIleValMETArgAspGln
 910 920 930 940 950 960
 AAGTGGAAATGCCTACAACGATGATCGAGATGATTGATCAAGAGGAAGAAAGCCAAA
 ValGluMETProThrThrMETIleAspGlnGluGluGluSerGlnThr
 970 980 990 1000 1010 1020
 CTGCCTGGAAAGAAAAATACCGTTTGCATCCATTATACAAATGAAACGGACTTAG
 AlaTrpLysGluLysTyrArgPheAlaIleHisHisTyrThrAsnGluThrAspLeuAla
 1030 1040 1050 1060 1070 1080
 CGGGAGTCGAAAGATAGATACGCTTATCCAAACAGGATTCACTTTGCCTGAAGGGATACA
 GlyValGluLysIleAspThrLeuIleGlnThrGlyPheThrLeuProGluGlyTyrLys
 1090 1100 1110 1120 1130 1140
 AATTAATCGCTGTTGACATTACGGAAAACAAAATTAGTCAGGAAACGGATTCATTAC
 LeuIleAlaValArgHisTyrGlyLysGlnAsnLeuValLysGluAsnThrLeuIleHis

Tabelle III (Forts.)

1150 1160 1170 1180 1190 1200
 ACGAAAAACCAGTTTGAAGTAAGTATTGTCGTGAATTAAAAGTAAAAATTAGGGGG
 AlaLysThrSerPheGluValSerIleCysArgGluLeuLysValIle---
 → Protein I

1210 1220 1230 1240 1250 1260
 AAATATTAATGGCATTGAAAGAGAATTATATTGTGATTATACACCGGGAGCTGCTAAAG
 (MET)AlaPheGluGluAsnLeuTyrCysAspTyrThrProGlyAlaAlaLysAla
 → Protein II

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 CGGTCGCGGGAAAGATGTAATTTAGCAGTTAACGCAAGCGGGGACAAACTATTAG
 ValAlaGlyLysAspValIleLeuAlaValPheAsnAlaAlaGlyAspLysLeuLeuAla

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 CGGTTGCGGGCCAACAAGGTCTAACTGTAAACCGTTCTAAAGATAGCATTGAAATTACAT
 ValAlaGlyGlnGlnGlyLeuThrValAsnArgSerLysAspSerIleGluIleThrSer

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 CTAAAGATACAGTTGGCGGATGGAAATCCAAAATTGGCGGTATGAAAGAATGGTCAATTG
 LysAspThrValGlyTrpLysSerLysIleGlyGlyMETLysGluTrpSerIleGlu

1450 1460 1470 1480 1490 1500
 AAAATGACGGATTATATGTCGCTGATGCAGAGTCTCACAAAGAATTGGCGAAATATTG
 AsnAspGlyLeuTyrValAlaAspAlaGluSerHisLysGluLeuAlaLysTyrPheGlu

1510 1520 1530 1540 1550 1560
 AAAGTGATAGCCCCGGTTGTGTGAAATCATTAATCAAGCATCTAAAAAGGTCTTTG
 SerAspSerProValCysValLysIleIleAsnGlnAlaSerLysGlyLeuPheGly

1570 1580 1590 1600 1610 1620
 GTGGTTGGCAATTGTAGCTGACTATAGTTTGAAAGCACCTTGTGACGAAGCGATGACTT
 GlyLeuAlaIleValAlaAspTyrSerPheGluAlaProPheAspGluAlaMETThrTyr

1630 1640 1650 1660 1670 1680
 ACTCTGAAACTAGACGGAATGGGCGCGCTTGTGATTAAACGATTACTGAGGGCGGCG
 SerValLysLeuAspGlyMETGlyAlaLeuValAspLeuThrIleThrGluGlyGlyAsp

1690 1700 1710 1720 1730 1740
 ACCAAATGCCCGGGAAACACCTGTAGCACCAGCAGAATAAAAGAAAGCCACTGAAAT
 GlnMETProGlyGluThrProValAlaProAlaGlu---
 → Protein II

- 29 -

Tabelle III (Forts.)

1750 1760 1770 1780 1790 1800
AAGTGGCTTCCCTTAGGAGGAAAATAAATGTTGAAGTGAATGATAACAACCTTATATT
METPheGluValAsnAspThrThrTyrIleLeu

1810 1820 1830 1840 1850 1860
ACGATTTATAAACAAAAAGTTAAAACGGTGGAATTAAACATCAGGGATTAGTTAGTTGC
ArgPheAsnLysGlnLysValLysThrValGluLeuThrSerGlyIleSerLeuValAla

1870 1880 1890
AGCTTTGACTGCGAATAAAGGGATTTGAG
AlaLeuThrAlaAsnLysGlyIleLeu

ERSATZBLATT

- 30 -

Patentansprüche

1. Nucleinsäure, welche bei den Hybridisierungsbedingungen 5 - 6 x SSC und 42 - 60°C mit dem 2,5kb großen KpnI-BamHI Fragment aus dem Plasmid pLM63 (DSM 5220) hybridisiert.
2. Nucleinsäure nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie bei den Hybridisierungsbedingungen 5-6xSSC und 42-60°C mit dem Nucleinsäurefragment nach Tabelle III hybridisiert.
3. Nucleinsäure nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der GC-Gehalt der Nucleinsäure 43% bis 60% beträgt.
4. Nucleinsäure nach Anspruch 1 bis 3, welche mit einem mindestens 27bp langen Ausschnitt oder der gesamten Nucleinsäure-Sequenz von Tabelle III identisch ist.
5. Nucleinsäure nach Anspruch 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine Markierung trägt.
6. Nucleinsäure nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß sie radioaktiv, mit Biotin, Avidin, Streptavidin, einem Fluoreszenzfarbstoff oder einem Hapten markiert ist.
7. Verfahren zur Bestimmung von Listeria-Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß die zu untersuchende sample mit einer probe nach Anspruch 4 oder 5 inkubiert wird und die Markierung durch ein geeignetes Nachweissystem bestimmt wird.

ERSATZBLATT

-31-

8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Hybridisierung bei einer Hybridisierungs-temperatur von 42°C bis 60°C und 5 - 6 x SSC durchgeführt wird.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß nach Hybridisierung bei 65°C bis 75°C gewaschen wird.
10. Protein, welches zu mindestens 80 % homolog zu der Aminosäuresequenz I, II oder III von Tabelle III ist.
11. Protein nach Anspruch 10 mit der Aminosäuresequenz Protein I, Protein II oder Protein III.
12. Verwendung der Proteine nach den Ansprüchen 10 oder 11 zur Herstellung von Antikörpern gegen Listeria-Bakterien.
13. Antikörper erhältlich durch Immunisierung von Versuchstieren mit einem Protein nach den Ansprüchen 10 oder 11.
14. Verwendung von Antikörpern nach Anspruch 13 zur immunologischen Bestimmung von Listeria-Bakterien.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/EP 90/00087

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int.Cl. ⁵: C 12 Q 1/68, C 07 K 15/28, C 07 K 13/00, G 01 N 33/569

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched ⁷

Classification System	Classification Symbols
Int.Cl. ⁵	C 12 Q; C 12 N; C 07 K

Documentation Searched other than Minimum Documentation
to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹

Category ¹⁰	Citation of Document, ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
P, A	WO, A1, 89/06699 (INSTITUT PASTEUR) 27 July 1989, see the whole document	1-14
P, A	EP, A2 0314294 (GENE-TRAK SYSTEMS) 3 May 1989, see the whole document	1-14
A	FR, A1, 2616804 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESEARCH FOUNDATION) 23 December 1988, see the whole document	1-14

* Special categories of cited documents: ¹⁰

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search

10 April 1990 (10.04.90)

Date of Mailing of this International Search Report

25 April 1990 (25.04.90)

International Searching Authority

EUROPEAN PATENT OFFICE

Signature of Authorized Officer

ANNEX TO THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT
ON INTERNATIONAL PATENT APPLICATION NO. PCT/EP 90/00087

SA 33845

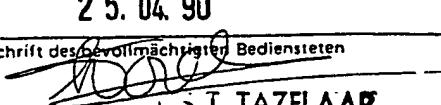
This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned international search report.
The members are as contained in the European Patent Office EPO file on 28/02/90
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A1- 89/06699	27/07/89	NONE	
EP-A2- 0314294	03/05/89	AU-D- 2213488	16/03/89
FR-A1- 2616804	23/12/88	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen **PCT/EP 90/00087**

I. KLASSEFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶							
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC IPC5: C 12 Q 1/68, C 07 K 15/28, C 07 K 13/00, G 01 N 33/569							
II. RECHERCHIERTE SACHGEBiete							
<table border="1"> <tr> <td align="center" colspan="2">Recherchierter Mindestpruflstoff⁷</td> </tr> <tr> <td align="center" colspan="2">Klassifikationssymbole</td> </tr> <tr> <td align="center">IPC5</td> <td align="center">C 12 Q; C 12 N; C 07 K</td> </tr> </table>		Recherchierter Mindestpruflstoff ⁷		Klassifikationssymbole		IPC5	C 12 Q; C 12 N; C 07 K
Recherchierter Mindestpruflstoff ⁷							
Klassifikationssymbole							
IPC5	C 12 Q; C 12 N; C 07 K						
Recherchierte nicht zum Mindestpruflstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸							
III. EINSCHLÄGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN⁹							
Art*	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³					
P,A	WO, A1, 89/06699 (INSTITUT PASTEUR) 27 Juli 1989, siehe Dokument insgesamt	1-14					
P,A	EP, A2, 0314294 (GENE-TRAK SYSTEMS) 3 Mai 1989, siehe Dokument insgesamt	1-14					
A	FR, A1, 2616804 (WASHINGTON STATE UNIVERSITY RESERACH FOUNDATION) 23 Dezember 1988, siehe Dokument insgesamt	1-14					

<p>* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰:</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die, das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>							
IV. BESCHEINIGUNG							
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts						
10. April 1990	25.04.90						
Internationale Recherchenbehörde	Unterschrift des bevollmächtigten Bediensteten						
Europäisches Patentamt	 J. T. TAZELAAR						

ANHANG ZUM INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHT
ÜBER DIE INTERNATIONALE PATENTANMELDUNG NR.

PCT/EP 90/00087

SA 33845

In diesem Anhang sind die Mitglieder der Patentfamilien der im obengenannten internationalen Recherchenbericht angeführten Patentdokumente angegeben.
Die Angaben über die Familienmitglieder entsprechen dem Stand der Datei des Europäischen Patentamts am 28/02/90
Diese Angaben dienen nur zur Unterrichtung und erfolgen ohne Gewähr.

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A1- 89/06699	27/07/89	KEINE	
EP-A2- 0314294	03/05/89	AU-D- 2213488	16/03/89
FR-A1- 2616804	23/12/88	KEINE	